

URSZULA SKOMRA**MARCIN PRZYBYŚ**

Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Porównanie metody polowej i laboratoryjnej oceny odporności chmielu na mączniaka prawdziwego (*Podosphaera macularis*)

A comparison of field and laboratory methods in assessment of hop resistance to powdery mildew (*Podosphaera macularis*)

Przedmiotem badań były dwa potomstwa chmielu zwyczajnego uzyskane w wyniku skrzyżowania odmiany chmielu Wye Target, będącej źródłem genu *R2* warunkującego odporność na mączniaka prawdziwego (*Podosphaera macularis*), z dwoma osobnikami męskimi charakteryzującymi się podatnością na tę chorobę. Wrażliwość genotypów chmielu na mączniaka prawdziwego określano przy użyciu dwóch metod: oceny występowania objawów choroby na szyszkach w warunkach naturalnej presji infekcyjnej oraz na podstawie stopnia porażenia liści po sztucznej inokulacji na szalkach w warunkach kontrolowanych. Oba testy odporności dały zgodny wynik w 88% przypadków. Zastosowanie testu szalkowego w pierwszym etapie selekcji pozwala na zmniejszenie liczby roślin ocenianych w warunkach polowych o ponad 70%. Ocena fenotypowa odporności na mączniaka prawdziwego jest w dużym stopniu uzależniona od wpływu środowiska, co czyni ją długotrwałą, pracochłonną i nie zawsze wiarygodną. Alternatywą dla tego typu oceny może być wykorzystanie markerów molekularnych identyfikujących określone geny odporności. W ramach prowadzonych badań wykorzystano markery molekularne losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (RAPD) do identyfikacji pojedynków posiadających gen odporności na mączniaka prawdziwego. Przetestowano 40 starterów, z których wytypowano 2 wykazujące asocjację z cechą odporności.

Słowa kluczowe: *Humulus lupulus*, odporność polowa, *Podosphaera macularis*, RAPD, sztuczna inokulacja

Two hop progenies from the crosses between hop cv. Wye Target, used as a source of *R2* gene determining resistance to hop powdery mildew (*Podosphaera macularis*), and two susceptible male plants were the objects of the work. The susceptibility of hop genotypes to powdery mildew was assessed using two methods: screening hop cones for disease symptoms in the field under natural infection pressure and artificial inoculation of detached hop leaves in Petri dishes, in controlled conditions. Both assessment methods gave the same results of resistance classification in 88% of individuals. The number of plants to be assessed in the field for cone infection would have been reduced by over 70% using the detached leaves inoculation in the early stage of selection. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to determine the presence of resistance gene. Until now

40 primers were tested. We report here the identification of two RAPD markers closely linked to a gene for resistance to *Podosphaera macularis*.

Key words: *Humulus lupulus*, field resistance, *Podosphaera macularis*, RAPD, artificial inoculation

WSTĘP

Mączniak prawdziwy chmielu powodowany przez grzyb *Podosphaera macularis* (Wallr.) jest jedną z najgroźniejszych chorób tej rośliny. W sprzyjających warunkach, przy niekontrolowanym rozwoju patogena, straty plonu mogą dochodzić nawet do 100% (Engelhard, 2005; Peetz, 2007). Odporność na mączniaka prawdziwego warunkują pojedyncze, dominujące geny, specyficzne w stosunku do rasy patogena (Liyanage i in., 1972). Dotychczas poznano osiem takich genów (*RB*, *R1*, *R2*, *R3*, *R4*, *R5*, *R6* i *RW*) (Seigner i in., 2001). Badania wykazały, że w różnych rejonach uprawy chmielu występują rasy *P. macularis* mające zdolność przełamania odporności determinowanej przez wszystkie te geny w warunkach szklarniowych (Seigner i in., 2001). W warunkach polowych została przełamana odporność determinowana przez geny *R1*, *R3*, *R5*, *R6* i *RB* (Darby, 1998). Najbardziej trwała w warunkach polowych jest odporność warunkowana przez gen *R2*, którego źródłem jest angielska odmiana Wye Target. Odmiana ta jest uprawiana w Wielkiej Brytanii od 35 lat i nadal utrzymuje wysoki poziom odporności na mączniaka prawdziwego (Darby i in., 1989; Seigner i in., 2001). W Polsce odmiana Wye Target nigdy nie była uprawiana na plantacjach produkcyjnych, ale jest ona utrzymywana w kolekcji odmian chmielu w IUNG-PIB w Puławach. Badania występowania objawów mączniaka prawdziwego chmielu prowadzone w warunkach naturalnej presji infekcyjnej potwierdziły wysoki poziom odporności tej odmiany również w naszym kraju (Skomra, 2004). Obecnie odmiana Wye Target jest wykorzystywana jako źródło odporności na mączniaka prawdziwego w programie hodowlanym w IUNG-PIB.

Podstawą hodowli odpornościowej jest selekcja perspektywicznych genotypów przy dużym nasileniu czynnika chorobotwórczego. W warunkach polowych fenotypowa ekspresja odporności jest często modyfikowana przez występowanie patogena oraz warunki środowiska. Polowa ocena odporności roślin na mączniaka prawdziwego musi być więc prowadzona przynajmniej przez kilka lat, aby selekcja była skuteczna. Wprowadzenie do oceny materiałów hodowlanych chmielu metod pozwalających na określenie odporności roślin w kontrolowanych warunkach środowiska znacznie przyspiesza proces selekcji, ponadto pozwala na zmniejszenie liczby genotypów przeznaczonych do oceny w warunkach polowych, co w przypadku chmielu jest niezwykle istotne z uwagi na duże koszty utrzymania plantacji.

Celem pracy było porównanie skuteczności różnych metod oceny odporności chmielu na mączniaka prawdziwego w aspekcie ich wykorzystania w pracach hodowlanych do selekcji genotypów odpornych. Wrażliwość genotypów chmielu na mączniaka prawdziwego określano przy użyciu dwóch metod: oceny występowania objawów choroby na szyszkach w warunkach naturalnej presji infekcyjnej oraz na podstawie stopnia porażenia liści po sztucznej inokulacji na szalkach w warunkach kontrolowanych.

Dodatkowo podjęto próbę wykorzystania markerów molekularnych RAPD do identyfikacji pojedynków posiadających gen odporności na mączniaka prawdziwego.

MATERIAŁ I METODY

Badania polowe

Materiał badawczy stanowiły dwa potomstwa chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.) uzyskane w wyniku skrzyżowania odmiany chmielu Wye Target, będącej źródłem genu *R2* warunkującego odporność na mączniaka prawdziwego, z dwoma osobnikami męskimi charakteryzującymi się podatnością na tę chorobę. Krzyżowania wykonano w 2004 r. Wiosną 2006 r. rośliny wysadzono na plantację hodowlaną, na której nie są prowadzone chemiczne zabiegi ochrony roślin. Odporność pojedynków na mączniaka prawdziwego oceniano na podstawie występowania objawów choroby na szyszkach w warunkach naturalnej presji infekcyjnej. Badania prowadzono w latach 2007–2008, po rozpoczęciu przez rośliny owocowania. Z każdej rośliny pobierano losowo 250 szyszek i oceniano stopień ich porażenia na podstawie wielkości powierzchni uszkodzonej przez chorobę (Skomra, 2004). Za rośliny odporne uznawano takie, których współczynnik porażenia szyszek nie przekraczał 2%.

Sztuczna inokulacja liści na szalkach

Wykonano badania odporności przy użyciu sztucznej inokulacji liści na szalkach Petriego. Z każdej rośliny zbierano młode, nie w pełni rozwinięte liście, które następnie rozkładano po dwie sztuki na szalkach wyłożonych wilgotną bibułą filtracyjną. Dla każdej rośliny przygotowano 3 szalki. Taki sam komplet szalek przygotowano dla odmian referencyjnych: Magnum — bardzo wrażliwej na mączniaka prawdziwego i Wye Target — odpornej na tę chorobę. Liście inokulowano zawiesiną zarodników konidialnych *P. macularis* w 0,005% roztworze Tween 20. Inokulum sporządzono przez zmycie zarodników konidialnych grzyba z powierzchni silnie porażonych liści odmiany Magnum. Koncentrację zarodników w zawiesinie sprawdzono przy użyciu hemacytometru. Inokulację przeprowadzono natychmiast po sporządzeniu zawiesiny zarodników przy użyciu ręcznego opryskiwacza. Szalki umieszczono w fitotronie w temperaturze 18–21°C przy 14. godzinnym fotoperiodzie. Codziennie monitorowano stan liści na szalkach. W razie potrzeby bibułę zwilżano wodą destylowaną. Po 14 dniach od inokulacji przeprowadzono obserwacje występowania kolonii *P. macularis* pod binokulem. Przeprowadzono dwie serie inokulacji z użyciem tych samych genotypów chmielu oraz przy zachowaniu takich samych warunków inkubacji.

Technika RAPD

Materiał badawczy stanowiły: odmiana Wye Target (posiadająca gen *R2*) oraz pojedynki ocenione jako odporne oraz podatne na mączniaka prawdziwego na podstawie sztucznej inokulacji w warunkach kontrolowanych, pochodzące z potomstwa odmiany Wye Target z dwoma osobnikami męskimi charakteryzującymi się podatnością na tę chorobę.

Izolacja całkowitych kwasów nukleinowych

W celu izolacji DNA z tkanek badanych pojedynczków, 100 mg świeżej tkanki roślinnej homogenizowano w moździerz z dodatkiem 650 µl buforu o składzie: 2% CTAB, 0,1M Tris-HCL pH 8,0, 20mM EDTA, 1,4M NaCl, 0,4% β-merkaptetanol. Homogenat przenoszono do probówki 1,5ml i inkubowano w 68°C przez 90 minut. Po wystudzeniu do temperatury otoczenia dodawano 850µl mieszaniny chloroform : alkohol izoamyłowy (24:1), wytrząsano, a następnie wirowano przy 14 000 obr./min. przez 10 minut w temperaturze 4°C. Uzyskaną po wirowaniu fazę wodną w ilości 400µl przenoszono do nowej probówki, dodawano 500 µl chloroformu, wytrząsano i wirowano w tych samych warunkach. Fazę wodną ponownie przenoszono do nowej probówki i ekstrahowano chloroformem. Następnie z fazy wodnej wytrącano DNA przez 12 godzin w temperaturze -20°C poprzez dodanie 0,6 objętości izopropanolu oraz 0,1 objętości 3M octanu sodu pH 7,4. Po wirowaniu z prędkością 14000 obr./min. przez 30 minut, osad przemywano dwukrotnie 80% etanolem, a następnie suszono próżniowo i zawieszano w 30 µl sterylnej wody Mili-Q. Oznaczanie ilościowe DNA prowadzono metodą spektrofotometryczną.

RAPD

Do reakcji PCR użyto następujących starterów: OPA-1, OPA-3, OPA-7, OPA-11, OPA-17, OPB-8, OPB-11, OPC-8, OPC-9, OPD-1, OPD-11, OPE-2, OPE-3, OPE-7, OPE-8, OPE-9, OPF-6, OPG-2, OPG-4, OPG-5, OPG-10, OPH-7, OPI-14, OPK-20, OPM-5, OPM-20, OPN-13, OPO-4, OPO-8, OPP-2, OPP-3, OPP-4, OPP-6, OPP-7, OPP-8, OPV-17, OPAA-11, OPAB-7, OPAB-8, OPAC-2.

Reakcję PCR prowadzono w końcowej objętości 20 µl mieszaniny reakcyjnej. Do 1 µl DNA (100 ng) uzyskanego po izolacji dodawano mastermix zawierający: 1 × bufor PCR (Fermentas), 0,5 µM startera, 500 µM mieszaniny dNTPs (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂ (Fermentas). Jako ostatnią dodawano polimerazę Taq w ilości 2,5U (Fermentas).

Amplifikacja obejmowała etapy:

- denaturacja wstępna: 95°C przez 2 minut,
- właściwa amplifikacja (42 cykle): denaturacja 95°C przez 30 sekund, annealing 35°C przez 30 sekund, elongacja 72°C przez 30 sekund,
- końcowa elongacja: 72°C przez 5 minut.

Elektroforeza produktów amplifikacji

Produkty amplifikacji analizowano w 1,7% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. Na żel nanoszono po 10µl mieszaniny po amplifikacji z dodatkiem 2 µl barwnika obciążającego 6 × Loading Dye (Fermentas). Jako marker wielkości wykorzystano marker 100bp (Fermentas). Elektroforezę prowadzono w buforze 1× TBE przy napięciu 5V/cm. Wynik elektroforezy oglądano pod UV i fotografowano.

WYNIKI I DYSKUSJA

Rozwój mączniaka prawdziwego chmielu jest uzależniony od warunków pogodowych, dlatego występowanie i nasilenie objawów choroby różni się w poszczególnych latach (Engelhard i in., 2001; Skomra, 2008). W warunkach naturalnych rozwój objawów choroby

oraz jej nasilenie są modyfikowane przez wiele czynników, z których najważniejsze to: obecność patogena, sprzyjające warunki atmosferyczne oraz podatność rośliny na porażenie. Dynamika poszczególnych czynników wpływających na rozwój infekcji w ciągu sezonu wegetacyjnego jest bardzo duża, toteż często nawet w przypadku roślin wrażliwych objawy choroby nie występują. W celu wyeliminowania tej sezonowej zmienności ocenę odporności poszczególnych genotypów na mączniaka prawdziwego w warunkach polowych należy prowadzić przez kilka lat. Zróżnicowanie występowania objawów mączniaka prawdziwego w warunkach polowych obserwowano również w niniejszych badaniach. Za odporne uznawano jedynie te rośliny, których współczynnik porażenia w żadnym roku badań nie przekroczył 2%, a wśród badanych szyszek nie stwierdzano silnie porażonych. Po dwuletniej obserwacji występowania objawów mączniaka prawdziwego na szyszkach w warunkach naturalnej presji infekcyjnej zidentyfikowano 12 roślin odpornych na tę chorobę (tab. 1).

Zastosowanie sztucznej inokulacji liści na szalkach Petriego, a następnie ich inkubacja w kontrolowanych, korzystnych dla rozwoju patogena warunkach temperatury i wilgotności eliminuje wpływ czynników atmosferycznych na rozwój patogena. Jest to stosunkowo prosta metoda, która może być stosowana w ciągu całego okresu wegetacyjnego. Dodatkową jej zaletą jest możliwość oceny młodych roślin, które nie weszły jeszcze w okres owocowania. Ma to szczególne znaczenie w przypadku badań nad chmielem, który zaczyna wytwarzać szyszki zazwyczaj dopiero w drugim roku wzrostu roślin w warunkach polowych, tj. po trzech latach od wykonania krzyżowania. Metoda ta przynosi bardzo dobre efekty w przypadku wielu gatunków roślin i patogenów (Olmstead i in. 2000; Browne, Cooke, 2004). Była ona również stosowana w badaniach nad mączniakiem prawdziwym chmielu (Seigner i in., 2001; Seigner i in., 2005). *P. macularis* może rozwijać się w szerokim zakresie temperatury, jednak najwięcej kolonii tworzy w temperaturze 18–21°C (Turechek i in., 2001). Takie optymalne warunki temperatury zastosowano podczas inkubacji szalek z inokulowanymi liśćmi chmielu. Do inokulacji pobierano zawsze liście najmłodsze, jeszcze nie w pełni rozwinięte, ponieważ są one najbardziej wrażliwe na porażenie (Seigner i in., 2003; Turechek i in., 2001). Pierwsze kolonie *P. macularis* obserwowano po 6 dniach od inokulacji, ale ostateczną ocenę przeprowadzono po 14 dniach. Nasilenie objawów było zróżnicowane od pojedynczych, małych kolonii widocznych tylko pod binokulem, do kilku, dobrze rozwiniętych kolonii na jednym liściu. Pojedynki, u których przynajmniej na jednym liściu stwierdzono kolonię grzyba z zarodnikami konidialnymi uznawano za wrażliwe na porażenie. Objawy mączniaka prawdziwego obserwowano na liściach 24 genotypów (tab. 1).

Oba testy odporności, tj. sztuczna inokulacja liści chmielu na szalkach oraz ocena porażenia szyszek w warunkach naturalnej presji infekcyjnej dały zgodny wynik w przypadku 30 z 34 badanych roślin. Spośród 10 genotypów uznanych za odporne na podstawie testu szalkowego, tylko jeden wykazywał objawy mączniaka prawdziwego na szyszkach w warunkach polowych. Oznacza to, że test wykorzystujący sztuczną inokulację liści chmielu na szalkach nadaje się do wstępnej weryfikacji roślin pod względem odporności na mączniaka prawdziwego. Zastosowanie tego testu w pierwszym etapie selekcji pozwala na zmniejszenie liczby roślin ocenianych w warunkach polowych. W

przypadku potomstw testowanych w niniejszych badaniach, na podstawie wyników testu szalkowego można było wyeliminować z dalszej oceny 24 wrażliwe genotypy, co stanowiło ponad 70% wszystkich badanych pojedynków.

Tabela 1

Porównanie metod fenotypowej oceny odporności genotypów chmielu na mączniaka prawdziwego oraz identyfikacji pojedynków posiadających gen odporności *R2* przy użyciu markerów RAPD
A comparison of phenotypical methods in assessment of hop genotypes for resistance to powdery mildew with identification of individuals possessing the *R2* resistance gene using RAPD markers

Genotypy chmielu Hop genotypes	Ocena polowa porażenia szyszek Screening hop cones in the field	Sztuczna inokulacja liści Artificial inoculation of detached leaves	RAPD
11/34	O	O	1
11/38	P	P	1
11/40	P	P	0
11/41	P	P	0
11/42	P	O	1
11/44	P	P	0
11/45	O	P	0
11/46	P	P	0
11/50	O	O	1
11/51	P	P	0
11/52	P	P	1
11/53	O	O	1
11/54	O	O	0
11/56	P	P	0
11/58	P	P	0
11/59	O	O	1
12/1	P	P	0
12/2	O	P	0
12/3	P	P	0
12/5	O	O	1
12/6	P	P	0
12/8	P	P	0
12/10	P	P	0
12/13	P	P	0
12/17	P	P	0
12/19	O	O	1
12/21	P	P	0
12/22	P	P	0
12/24	P	P	0
12/28	O	O	1
12/30	O	O	1
12/33	O	P	0
12/34	P	P	0
12/35	P	P	0

O — Odporny; Resistant

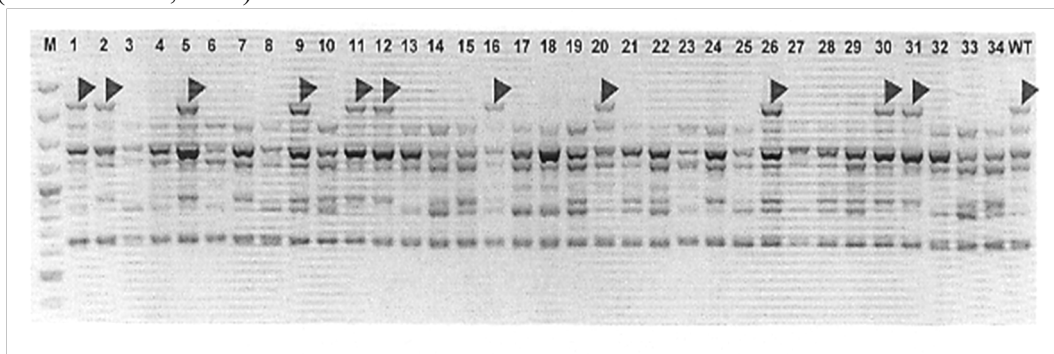
P — Podatny; Susceptible

1 — Obecność prążka; Band's presence

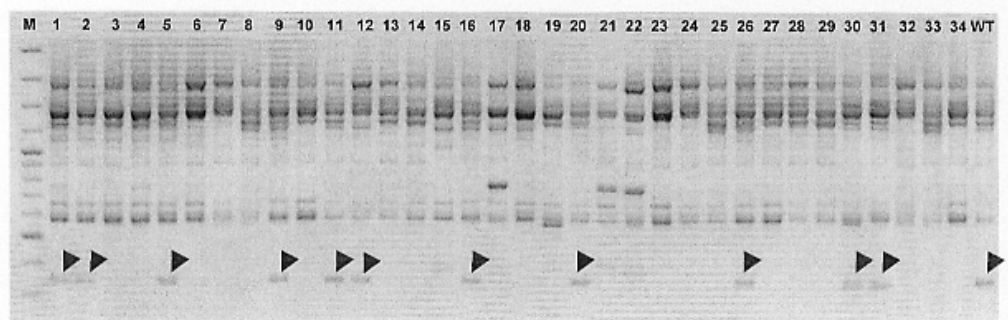
0 — Brak prążka; Band's absence

W ramach identyfikacji markerów RAPD sprzężonych z cechą odporności na mączniaka prawdziwego przebadano 40 różnych starterów RAPD reakcji PCR. Produkty amplifikacji miały wielkość od 150bp do 2500bp. Tylko 2 startery generowały fragmenty DNA wykazujące asocjację z cechą odporności. Przy użyciu startera OPC-9 uzyskiwano

różnicujący produkt o wielkości 1920bp (rys. 1), zaś w przypadku użycia OPG-10 marker o wielkości 350bp (rys. 2). W 91% były one zgodne z obserwacjami dokonanymi po sztucznej inokulacji. Odnotowano jedynie dwa przypadki (genotypy 11/38 i 11/52), kiedy liście na szalkach Petriego poddane sztucznej inokulacji uległy porażeniu przez mączniaka prawdziwego, a markery RAPD wskazywały na obecność genu odporności. Przypadki występowania specyficznych markerów odporności dla genu *R2* w roślinach chmielu podatnych na patogena miały miejsce również w badaniach nad markerami AFLP (Seefeldler i in., 2003).



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów RAPD po użyciu startera OPC-9. (M -marker GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, 1-34 – genotypy 11/34-12/35, WT – Wye Target
Fig. 1. Electrophoretic separation of RAPD products after using primer OPC-9. (M –DNA fragments size marker (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder), 1-34 – genotypes 11/34-12/35, WT – Wye Target



Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów R APD po użyciu startera OPG-10. (M -marker GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, 1-34 – genotypy 11/34-12/35, WT – Wye Target
Fig. 2. Electrophoretic separation of RAPD products after using primer OPG-10. (M –DNA fragments size marker (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder), 1-34 – genotypes 11/34-12/35, WT – Wye Target

Odnotowano również sytuację, kiedy liście poddane sztucznej inokulacji nie uległy porażeniu przez patogena, podczas gdy po elektroforezie nie był widoczny prążek — wskazując iż jest to roślina podatna (genotyp 11/54). Pojedyncze przypadki niezgodności wyników uzyskanych przy użyciu markerów RAPD z obserwacjami fenologicznymi nie wykluczają użycia tych markerów do selekcji.

WNIOSKI

1. Ocena odporności genotypów chmielu na podstawie występowania objawów mączniaka prawdziwego na szyszkach jest skuteczną metodą selekcji, jednak można ją zastosować dopiero po rozpoczęciu przez rośliny owocowania, tj. po 3 latach od wykonania krzyżowania.
2. Wykorzystanie metody sztucznej inokulacji liści na szalkach pozwala na rozpoczęcie selekcji pod kątem odporności na mączniaka prawdziwego już w pierwszym roku po wykonaniu krzyżowania, jeszcze przed wysadzeniem roślin w pole, co znacznie przyspiesza proces hodowlany.
3. Zastosowanie tego testu w pierwszym etapie selekcji pozwala na znaczne zmniejszenie liczby roślin chmielu ocenianych w warunkach polowych.
4. Wstępne badania nad poszukiwaniem markerów molekularnych RAPD wykazują, że markery te mogą być wykorzystywane do wstępnej selekcji pojedynków posiadających gen R2 odporności na mączniaka prawdziwego chmielu, co eliminuje pracochłonny etap sztucznej inokulacji.

LITERATURA

- Browne R. A., Cooke B. M. 2004. Development and evaluation of an in vitro detached leaf assay for pre-screening resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *European Journal of Plant Pathology* 110: 91 — 102.
- Darby P. 1998. The symptoms and biology of hop powdery mildew. *Amer. Soc. Of Brew. Chemists NET*. www.scisoc.org/hpmes/darby.htm
- Darby P., Godwin J. R., Mansfield J. W. 1989. The assessment of partial resistance to powdery mildew disease in hops. *Plant Pathology* 38: 219 — 225.
- Engelhard B., Goldbrunner Ch., Seigner E. 2001. Investigations on biology of hop powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) as a basis for specific strategies of control. *Proc. Technical Commission IHGC, Canterbury, England*: 29 — 45.
- Engelhard B. 2005. The impact of weather conditions on the behaviour of powdery mildew in infecting hop (*Humulus*). *Acta Hort.* 668: 111 — 116.
- Liyanage A. de S., Neve R. A., Royle D. J. 1972. Resistance to hop powdery mildew. *Rep. Dept. Hop Res. Wye Coll.*: 49 — 50.
- Olmstead J. W., Lang G. A., Grove G. G. 2000. A leaf disk assay for screening sweet cherry genotypes for susceptibility to powdery mildew. *Hort. Sci.* 35 (2): 274 — 277.
- Peetz A. B. 2007. Understanding sporulation and dissemination of *Podosphaera macularis*, hop powdery mildew. Thesis for degree of Master of Science. Oregon State University: 78 pp.
- Seefelder S., Seigner E. 2003. Molecular markers for powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) resistance in hops. *Proc. of Scientific Commission IHGC, Dobrna – Žalec, Slovenia*: 8 — 11.
- Seigner E., Seefelder S., Haugg B., Hesse H., Rösch H., Felsenstein F. 2001. Investigation on the virulence spectrum of hop powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*). *Proc. of Scientific Commission IHGC, Canterbury, Kent, England*: 33 — 37.
- Seigner E., Seefelder S., Haugg B., Engelhard B., Hasyn S., Felsenstein F. 2003. Infektionspotenzial des echten Mehltaus (*Sphaerotheca humuli*) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Hopfens (*Humulus lupulus*). *Gesunde Pflanzen*, 55. Jahrg., Heft 2: 29 — 33.
- Seigner E., Lutz A., Radic-Miehle H., Seefelder S. 2005. Breeding for powdery mildew resistance in hop (*Humulus L.*): strategies at the Hop Research Center, Huell, Germany. *Acta Hort.* 668: 19 — 29.
- Skomra U. 2004. Ocena wybranych odmian chmielu pod względem podatności na mączniaka rzekomego i prawdziwego chmielu. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 497: 581 — 589.

Skomra U. 2008. Występowanie mączniaka prawdziwego chmielu w zależności od odmiany i warunków klimatycznych. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 531: 193 — 200.

Turechek W. W., Mahaffee W. F., Ocamb C. M. 2001. Development of management strategies for hop powdery mildew in the Pacific Northwest. Online. Plant Health Progress DOI: 10.1094/PHP-2001-0313-01-RS.